



PCT/FR 03 / 03 665

REC'D 23 FEB 2004

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 19 DEC. 2003

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 0 II / 210502

REMISE DES PIÈCES DATE 13 DEC 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0215865 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 13 DEC. 2002		Reservé à l'INPI <input checked="" type="checkbox"/> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Cabinet ARMENGAUD AINE 3, Avenue Bugeaud 75116 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) CP/AC 60.859			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale N° _____ Date _____ ou demande de certificat d'utilité initiale N° _____ Date _____			
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale N° _____ Date _____			
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) SOUCHES BACTERIENNES DU GENRE EXIGUOBACTERIUM PROCEDE DE CULTURE ET APPLICATIONS			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale Prénoms Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF		INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (I.R.D.) Etablissement Public _____ _____	
Domicile ou siège Rue Code postal et ville Pays		213 Rue La Fayette 75116 PARIS CEDEX 10 FRANCE	
Nationalité N° de téléphone (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		Française _____ _____	
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			


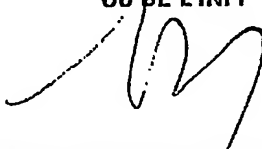
Remplir impérativement la 2^{ème} page

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 2/2

BR2

REMISE DES PIÈCES DATE 13 DEC 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0215865 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	DB 540 W / 210502
6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		7 INVENTEUR (S)	
Nom Prénom Cabinet ou Société N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel Adresse Rue Code postal et ville Pays N° de téléphone (facultatif) N° de télécopie (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		PEAUCELLE Chantal Cabinet ARMENGAUD AINE 92-1189 3, Avenue Bugeaud 75 111 61 PARIS FRANCE 01-45-53-05-50 01-45-53-80-21 armengau@club-internet.fr	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG	
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé « Suite », indiquez le nombre de pages jointes			
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Mandataire : Chantal PEAUCELLE Le 13 décembre 2002		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI  	

SOUCHES BACTERIENNES DU GENRE EXIGUOBACTERIUM
PROCEDE DE CULTURE ET APPLICATIONS

L'invention a pour objet de nouvelles souches du
5 genre Exiguobacterium.

Elle vise également un procédé de culture de ces
souches, ainsi que leurs applications industrielles.

10 L'invention se rapporte plus particulièrement à des
souches bactériennes telles qu'isolées d'échantillons
provenant de systèmes hydrothermaux marins profonds.

L'étude par les inventeurs des échantillons
prélevés les a conduit à isoler une nouvelle espèce
15 d'*Exiguobacterium* présentant des propriétés de grand
intérêt dans divers domaines de l'industrie.

L'invention a donc pour but de fournir des souches
de cette nouvelle espèce.

20

Elle vise également à fournir des protocoles de
culture de ces souches précisant les conditions physico-
chimiques et la composition du milieu de culture qui
permettent de produire favorablement des cellules et/ou
25 certains métabolites, plus particulièrement du L(+) lactate.

Selon un autre aspect, l'invention vise
l'utilisation directe de ces souches ou celle de leurs
30 métabolites dans divers domaines de l'industrie.

Les souches bactériennes de l'invention sont
caractérisées en ce qu'elles possèdent une séquence d'ADN
dont au moins une partie est capable de s'hybrider avec de

l'ADN génomique ou plasmidique de la souche déposée le 5 décembre 2002, sous le n° I-2962, à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (C.N.C.M.), 25 rue du Docteur Roux, 75015 PARIS.

5 De manière avantageuse, au moins 70 % du génome des souches de l'invention est capable de s'hybrider avec l'ADN de la souche déposée.

L'invention vise en particulier les souches bactériennes définies ci-dessus, caractérisées par la
10 séquence SEQ ID N°1 de l'ARNr 16S :

```

GCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGCAGGAAGCCGTCTGAACCCTTCGGGGGGACGACGGTGAATGA
GCGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTAAAGAACCCTGCCCATAGGTCTGGGATAACCACGAGAAATCGGGGCTAATACCGGAT
15 GTGTCATCGG
ACCGCATGGTCCGCTGATGAAAGGCGCTCCGGCGTCGCCCATGGATGGCTTTGCGGTGCATTAGCTAGTT
GGTGGGGTAA
CGGCCCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCT
20 ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGCTGAACGATG
AAGGCTTTTCG
GGTCGTAAAGTTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTGCCGCAGGCAATGGCGGCACCTTGACGGTACCTTGC
GAGAAAGCCA
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA
25 AGCGCGCGCA
GGCGGCCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGCCATTGGAAACTGGGAGGCTT
GAGTATAGGA
GAGAAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG
ACTCTTTGGC
30 CTATAACTGACGCTGAGGCTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGA
GTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGTCTGAAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGT
ACGGTCGCAA
GGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACG
35 CGAAGAACCT
TACCAACTCTTGACATCCCCCTGACCGGTACAGAGATGTACCTTCCCCTTCGGGGGCAGGGGTGACAGGT
GGTGCATGGT
TGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGCC
AGCATThAGT
40 TGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCC
TTATGAGTTG
GGCTACACACGTGCTACAATGGACGGGTACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCCAGAAAG
CCGTTCTCAG
TTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGACGATACTGCG
45 GTGAATACGT
TCCCAGGTCTTGTAACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCG
TAAGGAGCCA
GCCGCCGAAGGTGGGGCAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGA

```

50

ou une séquence ayant une similitude avec SEQ ID N°1 supérieure à 97%.

Selon un autre aspect, ces souches sont caractérisées en ce qu'elles sont thermotolérantes, 5 saccharolytiques et amylolytiques et/ou qu'elles sont capables de produire du lactate.

On notera que, de manière avantageuse, le lactate produit est à plus de 95 % du L(+) lactate.

Par l'expression "thermotolérante", on entend des 10 souches bactériennes capables de croître à des températures de l'ordre de 40 à 50°C, à un pH de 5,4 à 9,15, avec un optimum pour la croissance à 45°C, à un pH de 7 environ.

L'invention vise plus particulièrement des souches du genre Exiguobacterium tel que montré par comparaison des 15 séquences de l'ARN de la fraction 16 S des ribosomes.

Ces souches sont encore caractérisées par le fait qu'elles ne réduisent pas le sulfate, le thiosulfate, le soufre, le sulfite.

Les souches bactériennes de l'invention sont encore 20 caractérisées en ce qu'elles sont Gram positif.

Selon encore une autre disposition, la teneur de l'ADN des souches bactériennes de l'invention en guanine plus cytosine est de l'ordre de 50 mole %.

L'invention vise en particulier la souche 25 bactérienne déposée à la C.N.C.M. le 05 décembre 2002 sous le n° I-2962.

La référence d'identification de cette souche est 10C. Comme nom de désignation taxonomique, on utilisera Exiguobacterium lactigenes sp. nov.

30 Les mutants des souches répondant aux définitions qui précèdent entrent également dans le cadre de l'invention dès lors qu'ils conservent au moins 70 % de capacité d'hybridation avec l'ADN génomique de la souche déposée.

Conformément à l'invention, les souches bactériennes définies ci-dessus sont obtenues par culture dans des conditions anaérobies facultatives, à un pH de 5,4 à 9,15, à 37°C, dans un milieu de base comme défini ci-après, contenant un sucre utilisable par ces souches comme source d'énergie.

Les souches bactériennes de l'invention sont avantageusement utilisées dans des procédés de fermentation alimentaire. Leurs propriétés fermentaires et enzymatiques permettent d'y remplacer avantageusement et/ou de compléter celles attribuées aux bactéries lactiques utilisées habituellement.

La capacité des souches de l'invention à fermenter une grande variété de sucres, notamment le D-glucose, le D-fructose, le D-galactose, le D-mannose, le mannitol, le D-ribose, le D-saccharose et le DL-maltose et l'amidon constitue un atout important. Certains de ces sucres (glucose, fructose, saccharose) potentiellement utilisables comme substrats énergétiques sont, en effet, disponibles en grande quantité, notamment dans les jus fermentaires sucriers.

La possibilité d'agir sur le métabolisme de ces souches en contrôlant les paramètres physico-chimiques du milieu de culture (pH, rapport sucres/peptides) élargit leur domaine d'application. Ainsi, il est possible par exemple d'orienter la fermentation vers la production de cellules et de métabolites cellulaires tels que des enzymes.

L'invention vise donc également un procédé de production de métabolites, en particulier de L(+) lactate, caractérisé en ce qu'il comprend

- la culture d'une souche bactérienne telle que définie ci-dessus, dans des conditions appropriées pour son

développement et pour la production du métabolite recherché,

- la récupération des métabolites produits, suivi de l'isolement du métabolite désiré et sa purification.

5 L'acide lactique produit par les souches de l'invention est d'un grand intérêt car il est constitué à plus de 95 % par du L(+) lactate qui est assimilable par les organismes supérieurs alors que le D(-) lactate présente un caractère de toxicité.

10 On le sépare de la culture, et on le concentre par exemple par évaporation, le cas échéant jusqu'à siccité.

Les concentrés ou produits secs sont utilisés tels quels ou traités pour former des dérivés souhaités de l'acide lactique.

15 Les applications de l'acide lactique ou de ses esters et autres dérivés concernent de nombreux domaines.

L'acide lactique est ainsi utilisé dans l'industrie agro-alimentaire en l'incorporant dans des boissons, des bières, des produits laitiers tels que crème, fromage, 20 beurre, des glaces ou encore des confitures.

Comme tensio-actif, on l'utilisera avec avantage en panification et viennoiserie sous forme par exemple de lactyl mono- et diglycérides et de sodium stéaryl lactylate.

25 Dans l'industrie pharmaceutique, le lactate de potassium peut constituer un substitut du chlorure de sodium particulièrement précieux dans les cas d'hypertension.

Il est aussi utilisé pour ses propriétés de 30 complexant, notamment avec le fer et le calcium pour traiter les carences.

Enfin parmi les applications de l'acide lactique, de ses sels et dérivés dans l'industrie chimique, on citera son utilisation dans l'élaboration de résines plastiques,

d'adhésifs, de pesticides, de textiles, ou encore dans des peintures, des diluants et des solvants, ou pour le traitement de surface de métaux.

On soulignera son grand intérêt dans la chimie des polymères où il sert à fabriquer des polylactides et/ou des copolymères avec par exemple des oxydes de polyalkylène, des alcools polyvalents, de l'acide glycolique, des acides hydroxycarboxyliques, des copolymères d'éthylène et de propylène, des caoutchoucs butyliques ou des élastomères de polyuréthane thermoplastiques. A partir de ces polymères et/ou copolymères, divers articles peuvent être fabriqués en particulier pour l'emballage, des films à usages médicaux pour réaliser des pansements ou encore des matières d'enrobage pour sutures chirurgicales.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention sont rapportés dans la description qui suit, donnée à titre d'exemple, qui concerne la souche 10C mentionnée plus haut, déposée à la C.N.C.M. sous le n°I-2962.

a. Protocole d'isolement de la souche 10C

L'isolement a été effectué à partir d'échantillons de systèmes hydrothermaux profonds marins.

. Milieux et méthodes de culture

On utilise un milieu de base contenant (pour 1 litre d'eau distillée) : 1g de NH_4Cl , 0,3g de KH_2PO_4 , 0,3g de K_2HPO_4 , 25g de NaCl , 0,2g de CaCl_2 , 0,1g de KCl , 3g de MgCl_2 , 0,5g de CH_3COONa , 0,5g de cystéine-HCl, 0,1g d'extrait de levure (Difco Laboratories), 10ml d'une solution minérale de Balch (1), 1mg de résazurine. Le pH est ajusté à 7,3 avec KOH 10M et le milieu est porté à ébullition sous un courant d'azote et refroidi jusqu'à la température ambiante.

Les compositions de la solution minérale de Balch et de la solution d'oligoéléments de Balch sont les suivantes :

5

Solution minérale de Balch

	KH_2PO_4	6	g
	$\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6	g
	NaCl	12	g
10	$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	2,6	g
	$\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	0,16	g
	H_2O distillée q.s.p.	1000	ml

Solution d'oligo-éléments de Balch

15	Acide nitriloacétique	1,5	g
	$\text{MnSO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	0,5	g
	$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	3	g
	NaCl	1	g
	$\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,1	g
20	$\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	0,1	g
	$\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	0,1	g
	ZnCl_2	0,1	g
	$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0,01	g
	$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$	0,01	g
25	H_3BO_3	0,01	g
	Na_2MoO_4	0,01	g
	H_2O distillée q.s.p.	1000	ml

Le pH du milieu de culture est ajusté à pH 7,3 avec
30 KOH 10 M.

Le milieu est ensuite porté à ébullition, puis refroidi jusqu'à la température ambiante et réparti sous un courant d'azote dans des tubes de Hungate, à raison de 5 ml

par tube, et dans des flacons de sérum, à raison de 20ml sous courant d'azote et de gaz carbonique (80 :20 ;v/v).

Après traitement à l'autoclave des récipients scellés à 110°C pendant 45 min, on ajoute Na₂S, 9H₂O, Na₂CO₃ et du glucose, à partir de solutions stériles, ce qui conduit, respectivement à des concentrations de 0,04%, 0,2% et 20mM.

Pour initier l'enrichissement de la culture, on inocule un échantillon de 20ml de milieu, et on incube à 37°C. La culture est purifiée en utilisant la méthode des rolls tubes de Hungate avec un milieu solidifié avec 15g/l d'agar.

b. Description de la souche

La souche 10C est une bactérie à Gram positif, non sporulante, anaérobie facultative, se présentant sous forme de bâtonnets, avec une croissance optimale à 45°C, à pH 7 et 0-2% de NaCl.

Il s'agit d'une souche hétérotrophe qui requiert de l'extrait de levure pour fermenter les sucres.

La température de croissance de la souche est de 12 à 50°C, à un pH de 5,4 à 9,1, et une concentration en NaCl entre 0 et 12%.

On observe une croissance optimale à 45°C, à pH 7 et 0-2% de NaCl.

Dans un milieu contenant des hydrates de carbone, notamment du glucose comme source d'énergie, on ajoutera avec avantage des peptides, par exemple des extraits de levure, pour favoriser la croissance.

- propriétés métaboliques

La fermentation de sucres conduit essentiellement à du (L+)lactate (environ 2 moles de lactate/mole de glucose fermenté). Dans des conditions de croissance adaptées, on observe la production de formate, acétate et éthanol.

5 Caractères génétiques :

La souche 10C est caractérisée par une teneur de l'ADN en guanine + cytosine de 50,4 mole%.

La purification et l'extraction de l'ADN, l'amplification et le séquençage de l'ARNr 16S sont réalisés selon (2), (3) et (4). L'ADN a été isolé par chromatographie sur hydroxyapatite selon le procédé de Cashion et al (5). L'hybridation ADN-ADN a été effectuée comme décrit par De Ley et al (6), avec la modification décrite par Huss et al (7) et Escara et Hutton (8) en utilisant un spectrophotomètre modèle 2600 équipé d'un thermoprogramme 2527-R (Gilford Instrument Laboratories Inc., Oberlin, Ohio, EUA).

La séquence de l'ARNr 16S correspond à SEQ ID N° 1 donnée ci-dessus.

20 c. Procédés de culture et applications

1- PRODUCTION DE BIOMASSE PAR FERMENTATION DE SUCRE
On opère en milieu non renouvelé.

La fermentation est régulée à un pH de 7 à l'aide d'une solution alcaline (soude par exemple) et à une température de 45°C. On utilise un milieu de culture répondant à la composition suivante :

	- Glucose	à calculer
	- Extrait de levure/hydrolysate de protéines	à calculer
	- NH_4Cl	1 g/l
	- NaCl	0,5 g/l
5	- KH_2PO_4	0,3 g/l
	- K_2HPO_4	0,3 g/l
	- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,2 g/l
	- KCl	0,1 g/l
	- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1 g/l

10 Les concentrations en sucre et en extraits de levure sont fonction de la concentration en cellules que l'on souhaite obtenir.

15 Le sucre est autoclavé séparément du reste du milieu de culture, ainsi que certains sels minéraux qui forment un précipité lors de l'autoclavage. Ils sont ensuite ajoutés stérilement à l'autre partie du milieu de culture (extrait de levure + minéraux, autoclavés ensemble), puis le volume final est ajusté avec de l'eau distillée stérile. L'exemple
20 ci-dessous permet de mieux comprendre le protocole de préparation des milieux :

Exemple de préparation de 16 litres d'un milieu à 40 g/l de
25 saccharose et 3 g/l d'extrait de levure :

1° Pesée et autoclavage

	Concentration	Masse à peser	
Saccharose	40 g/l	640 g	Dans env. 500 ml
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,2 g/l	3,2 g	d'eau distillée.
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1 g/l	1,6 g	Autoclavage 110°C,
5			20 à 30 min.
Extrait			
de levure	3 g/l	48 g	
NH ₄ Cl	1 g/l	16 g	
KH ₂ PO ₄	0,3 g/l	4,8 g	Dans env. 15 l d'eau
10 K ₂ HPO ₄	0,3 g/l	4,8 g	distillée.
NaCl	0,5 g/l	8 g	Autoclavage 121°C, 1h30.
KCl	0,1 g/l	1,6 g	

NB : le sucre est autoclavé dans un faible volume de
 15 liquide et seulement 20 minutes à 110°C pour éviter
 l'hydrolyse du saccharose. Les sels de magnésium et de
 calcium sont autoclavés à part des autres sels et de
 l'extrait de levure afin d'éviter toute précipitation.

20 2° Assemblage : la solution à base de sucre est transférée
 dans les 15 litres de milieu contenant l'extrait de levure,
 puis de l'eau distillée stérile est ajoutée pour compléter
 jusqu'à 16 litres. Tous ces transferts se font stérilement,
 autour de la flamme d'un Bec Bunsen, au moyen d'une
 25 surpression d'azote appliquée dans le fût à vider pour
 pousser le liquide.

3°) Homogénéisation : un flux d'azote N₂ est mis à buller
 dans le milieu ainsi assemblé afin de mélanger tous les
 30 éléments et d'assurer l'anaérobiose.

2. Mode de fermentation

Les études ont été réalisées en mode discontinu, ou batch, rendu continu par l'enchaînement des batchs. Il s'agit d'un système de "feed-harvest", ou "batchs répétés", qui se schématise par l'enchaînement séquentiel de trois étapes : remplissage du fermenteur par du milieu neuf, puis culture des bactéries en batch, puis vidange du moût de fermentation en laissant un pied de cuve pour l'inoculation du batch suivant, puis nouveau remplissage, etc.

10 D'un point de vue pratique, l'avantage de ce système réside dans le fait que les phases de nettoyage et de stérilisation du fermenteur entre deux batchs sont supprimées, et dans la possibilité d'automatisation du procédé. En effet, il est possible de programmer un

15 automate qui déclenche les opérations de vidange et de remplissage selon la valeur de paramètres acquis en ligne par une unité de régulation.

II. PRODUCTION DE BIOMASSE PAR FERMENTATION D'AMIDON

20

Dans d'autres expérimentations, en utilisant un substrat d'amidon et le milieu tamponné défini ci-dessus (mais avec 10 g d'amidon par litre), on obtient une transformation de l'amidon donnant plus de 95% de L(+) lactate et des traces

25 de formiate.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Balch W.E. et al, 1979, Microbiol. Rev. 43,260-296,
- 5 (2) Andrews K.T. & Patel B.K.C., 1996, Int. J. Syst. Bacteriol. 46, 265-269,
- (3) Love C.A. et al, 1993, Syst. Appl. Microbiol. 16, 244-251,
- (4) Redburn A.C. & Patel B.K.C., 1993, FEMS Microbiol. Lett. 10 113, 81-86.
- (5) Cashion P., 1977, Anal. Biochem, 81:461-466.
- (6) De Ley J, 1970, Eur. J. Biochem, 12:133-142,
- (7) Huss V.A.R., 1983, J. Syst. Appl. Microbiol, 4: 184-192,
- 15 (8) Escara J.F., 1980, Biopolymers, 19: 1315-1327.

REVENDEICATIONS

1/ Souches bactériennes, caractérisées en ce qu'elles possèdent une séquence d'ADN dont au moins une
 5 partie est capable de s'hybrider avec de l'ADN génomique ou plasmidique de la souche déposée le 5 décembre 2002, sous le n° I-2962, à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (C.N.C.M.).

10 2/ Souches bactériennes selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'au moins 70 % de leur génome est capable de s'hybrider avec l'ADN de la souche déposée.

15 3/ Souches bactériennes selon la revendication 1 ou 2, caractérisées par la séquence SEQ ID N°1 de l'ARNr 16S :

GCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGCAGGAAGCCGTCTGAACCCTTCGGGGGGACGACGGTGGAATGA
 GCGGCGGACG
 GGTGAGTAACACGTAAGAACCCTGCCCATAGGTCTGGGATAACCACGAGAAATCGGGGCTAATACCGGAT
 20 GTGTCATCGG
 ACCGCATGGTCCGCTGATGAAAGGCGCTCCGGCGTCGCCCATGGATGGCTTTGCGGTGCATTAGCTAGTT
 GGTGGGGTAA
 CGGCCCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
 CCAGACTCCT
 25 ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATG
 AAGGCTTTTCG
 GGTCGTAAAGTTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAAGTGCCGAGGCAATGGCGGCACCTTGACGGTACCTTGC
 GAGAAAGCCA
 CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAA
 30 AGCGCGCGCA
 GGCGGCCTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGAGGGCCATTGGAACTGGGAGGCTT
 GAGTATAGGA
 GAGAAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCG
 ACTCTTTGGC
 35 CTATAACTGACGCTGAGGCTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
 TAAACGATGA
 GTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGAAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGT
 ACGGTCGCAA
 GGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCAAGCAACG
 40 CGAAGAACCCT
 TACCAACTCTTGACATCCCCCTGACCGGTACAGAGATGTACCTTCCCCTTCGGGGGCAGGGGTGACAGGT
 GGTGCATGGT
 TGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTGCC
 AGCATTTAGT
 45 TGGGCAC'TCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCC
 TTATGAGTTG
 GGCTACACAGTGTACAATGGACGGTACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCCAGAAAG
 CCGTTCTCAG

TTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCG
 GTGAATACGT
 TCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCG
 TAAGGAGCCA
 5 GCCGCCGAAGGTGGGGCAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGA

ou une séquence ayant une similitude avec SEQ ID
 N°1 supérieure à 97%.

10 4/ Souches bactériennes selon l'une quelconque des
 revendications 1 à 3, caractérisées en ce qu'elles sont
 thermotolérantes, saccharolytiques et amylolytiques et/ou
 capables de produire du L(+)lactate.

15 5/ Souches selon l'une quelconque des
 revendications 1 à 4, caractérisées par des propriétés de
 croissance à des températures de l'ordre de 40 à 50°C, à un
 pH de 5,4 à 9,15, avec un optimum pour la croissance à
 45°C, à un pH de 7 environ.

20 6/ Souches bactériennes selon l'une quelconque des
 revendications 1 à 5, caractérisées par une teneur de leur
 ADN en guanine et cytosine de 50 mole% environ.

7/ Souche bactérienne déposée à la C.N.C.M. le 5
 décembre 2002, sous le numéro I-2962.

25 8/ Procédé de culture de souches bactériennes selon
 l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en
 ce qu'on opère dans des conditions anaérobies facultatives,
 à un pH de 5,4 à 9,15 environ, à 37°C, en particulier de
 6,5 à 7,5, dans un milieu de base contenant un sucre
 utilisable par ces souches comme source d'énergie.

30 9/ Application des souches bactériennes selon l'une
 des revendications 1 à 7, dans des procédés de fermentation
 alimentaire.

10/ Procédé de production de métabolites tels que
 le L(+) lactate, caractérisé en ce qu'il comprend

35 - la culture d'une souche bactérienne selon l'une
 quelconque des revendications 1 à 7 dans des conditions

appropriées pour son développement et pour la production du métabolite recherché,

- la récupération des métabolites produits, l'isolement du métabolite désiré et sa purification.

SEQUENCE LISTING

<110> INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (I.R.D.)

<120> SOUCHES BACTERIENNES DU GENRE EXIGUOBACTERIUM PROCEDE
DE CULTURE ET APPLICATIONS

<130> CP/VB 60859

<140> 0215865

<141> 2002-12-13

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1510

<212> DNA

<213> Exiguobacterium acetylicum

<220>

<221> misc_feature

<222> (1117)..(1117)

<223> unknown

<400> 1

gcgtgcctaa tacatgcaag tcgagcgcag gaagccgtct gaacccttcg gggggacgac	60
ggtggaatga gcggcggacg ggtgagtaac acgtaaagaa cctgcccata ggtctgggat	120
aaccacgaga aatcggggct aataccggat gtgtcatcgg accgcatggg ccgctgatga	180
aaggcgctcc ggcgtcgccc atggatggct ttgcggtgca ttagctagtt ggtggggtaa	240
cggcccacca aggcgacgat gcatagccga cctgagaggg tgatcgcca cactgggact	300
gagacacggc ccagactcct acgggaggca gcagtaggga atcttcaca atggacgaaa	360
gtctgatgga gcaacgccgc gtgaacgatg aaggctttcg ggtcgtaaag ttctgttgta	420
aggggaagaac aagtgcgcga ggcaatggcg gcaccttgac ggtaccttgc gagaaagcca	480
cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtagggt gcaagcgttg tccggaatta	540
ttgggcgtaa agcgcgcgca ggcggcctct taagtctgat gtgaaagccc ccggctcaac	600
cggggagggc cattggaaac tgggaggctt gagtatagga gagaagagtg gaattccacg	660
tgtagcgggtg aaatgcgtag agatgtggag gaacaccagt ggcgaaggcg actctttggc	720
ctataactga cgctgaggct gcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga taccctggta	780
gtccacgccg taaacgatga gtgctagggt ttggagggtt tccgcccttc agtgctgaag	840
ctaacgcatt aagcactccg cctggggagt acggtcgcaa ggctgaaact caaaggaatt	900
gacggggacc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgaagaacct	960
taccaactct tgacatcccc ctgaccggta cagagatgta ccttccccct cgggggcagg	1020
ggtgacaggt ggtgcatggt tgcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccc	1080

caacgagcgc aacccttgtc cttagttgcc agcattnagt tgggcactct agggagactg	1140
ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaata atcatgcccc ttatgagttg	1200
ggctacacac gtgctacaat ggacggtaca aagggcagcg aagccgcgag gtggagccaa	1260
tcccagaaaag ccgtttctcag ttcggattgc aggctgcaac tcgcctgcat gaagtcggaa	1320
tcgctagtaa tcgcaggtca gcatactgcg gtgaatacgt tcccgggtct tgtacacacc	1380
gcccgtcaca ccacgagagt ttgcaacacc cgaagtcggt gaggtaaccg taaggagcca	1440
gccgccgaag gtggggcaga tgattggggg gaagtcgtaa caaggtagcc gtatcggaag	1500
gtgcggctga	1510

**BREVET D'INVENTION****CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*03

DÉPARTEMENT DES BREVETS26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1../1..(À fournir dans le cas où les demandeurs et
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 G W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		CPI/AC 60.859
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02.15.865
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
SOUCHES BACTERIENNES DU GENRE EXIGUOBACTERIUM, PROCEDE DE CULTURE ET APPLICATIONS		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
I.R.D.		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1 Nom		FARDEAU
Prénoms		Marie-Laure
Adresse	Rue	Chemin de Bellepeire
	Code postal et ville	[1.3.1.7.0] LES PENNES-MIRABEAU
Société d'appartenance (facultatif)		
2 Nom		COMBET-BLANC
Prénoms		Yannick
Adresse	Rue	21 rue Dragon
	Code postal et ville	[1.3.0.0.6] MARSEILLE
Société d'appartenance (facultatif)		
3 Nom		OLLIVIER
Prénoms		Bernard
Adresse	Rue	Quartier Valcros
	Code postal et ville	[1.3.3.6.0] ROQUEVAIRE
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
Le 13 décembre 2002 Mandataire : Chantal PEAUCELLE n° 92-1189		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

PCT Application

PCT/FR2003/003665



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.